

別紙 1

論文審査の要旨

| | | | |
|--|------------|--------|-------|
| 報告番号 | 甲 第 2691 号 | 氏 名 | 榎本 拓哉 |
| 論文審査担当者 | 主査 | 口腔微生物学 | 桑田 啓貴 |
| | 副査 | 口腔病理学 | 美島 健二 |
| | 副査 | 口腔外科学 | 代田 達夫 |
| <p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Identification of cell populations that possess osteoclast differentiation potential induced by LPS」について、上記の主査1名、副査2名が個別に審査を実施した。</p> <p>【目的】破骨細胞の前駆細胞（破骨前駆細胞）は、単球・マクロファージ系の細胞であり、歯周炎やインプラント周囲炎などの炎症では骨髄、脾臓および血液から歯槽骨の炎症部位に動員され、破骨細胞に分化すると考えられている。しかし、破骨前駆細胞がいかなる性質を持ち、細菌誘導性の炎症とどのように関係しているのか詳細は不明である。これを解明するために CD11b, c-Fms などの単球・マクロファージ系細胞が発現する分子を指標として細胞を分離し、それぞれの破骨細胞分化能を解析した。</p> <p>【方法】マウスの骨髄、脾臓、および血液より細胞を採取し、フローサイトメトリーや磁性体標識抗体を用いて、CD11b, c-Fms などの単球・マクロファージ系細胞が発現する分子を指標として細胞を分離し、それぞれの破骨細胞分化能を解析した。これらの細胞を破骨細胞分化誘導因子である RANKL および M-CSF の存在下で培養し、破骨細胞分化能を TRAP 染色にて評価した。また、LPS または生理食塩水を腹腔内投与し、24 時間後に採取した細胞を用いて同様の実験を実施した。</p> <p>【結果】正常マウスの骨髄では、主に CD11b⁺-細胞が破骨細胞に分化した。脾臓では、CD11b⁺ および CD11b⁻-細胞集団いずれにおいても破骨細胞に分化した細胞数は極めて少なかったが、高密度培養により CD11b⁺-細胞が破骨細胞に分化することが判明した。血液では、主に CD11b⁺-細胞が破骨細胞に分化した。同様に RANK, CD14, c-Fms を指標として細胞を分離し検討したところ、c-Fms⁺-細胞はいずれの組織でも破骨細胞に分化した。次に、LPS 投与マウスを解析したところ、骨髄や脾臓で CD11b⁺-CD14⁺-c-Fms⁺-細胞が有意に増加し、それらは破骨細胞に分化した。</p> <p>【結論】LPS により骨髄と脾臓に破骨細胞分化能をもつ CD11b⁺-細胞が増加することを見いだした。この細胞集団は、炎症時の破骨前駆細胞として機能している可能性がある。</p> | | | |

(主査が記載)

本論文の審査にあたり副査から多くの質問があり,その一部と回答を示す.

美島委員の質問とそれに対する回答

1. CD11b+c-Fms+CD14+細胞の population は組織によって違いがあるのか.

我々が行ったフローサイトメトリー解析によれば,CD11b+細胞中の CD11b+c-Fms+CD14+細胞の割合は,骨髄 16%(CD11b50%中),脾臓 11.96%(CD11b 4 % 中),血液 29.74%(CD11b1%中)で,各組織に存在する細胞集団の比率は大きく異なっている.さらに,骨髄,脾臓および血液の CD11b+c-Fms+CD14+細胞は破骨細胞に分化することを確認している.CD11b+c-Fms+CD14+細胞は破骨細胞分化能を持つことは共通しているが,今後更なる違いを確認するためにマイクロアレイなどの遺伝子学的解析やその他のマーカーによる違いなど詳しく解析する必要がある.

2. 脾臓において髄外造血が行われている可能性はあるか.

血液(白血球,赤血球,血小板)は骨髄の造血幹細胞から分化するが,慢性骨髄性白血病や骨髄線維症では,脾臓や肝臓が腫大し未熟な赤血球が産生される髄外造血が起こる.このことは,脾臓や肝臓には赤血球の元の細胞である造血幹細胞が存在することを示唆する(Hinton et al,2014).本研究においては,LPS を全身投与することで今まで破骨細胞分化能をあまり待たない脾臓の CD11b+細胞が破骨細胞に分化した.一方で,C3H/HeJ マウスを用いたとき脾臓の CD11b+細胞集団は破骨細胞分化が抑制された.以上の結果から,LPS-TLR4 のシグナルを介した免疫応答によるものだと考えられる.LPS により,骨髄が抑制され一時的に脾臓で髄外造血が引き起こされることは考えられるが,このことを解明するには LPS 投与マウスの脾臓を組織学的な手法で解析する必要がある.

代田委員の質問とそれに対する回答

1. 今回のモデルは菌血症等全身の炎症性疾患のモデルではないかと思われる.

歯周炎等,局所の炎症病変と破骨細胞分化との関連については,今回の実験系で説明することが可能といえるのか.すなわち局所の炎症でも今回の実験結果と同様の傾向が得られると考えられるのか.

重度歯周炎患者では,心臓やアテローム性動脈瘤で歯周病原菌が見つかるなど全身に LPS など菌体成分が循環していることが考えられる(Werdan et al. 2014).これらのことから本研究では LPS を全身に投与することによって骨髄,脾臓および血液の影響について研究を行った.本研究では LPS を全身に投与することで骨髄と脾臓の破骨前駆細胞の性質が大きく変化した,局所の炎症が我々の結果と同じく骨髄や脾臓に影響を及ぼすのかについては歯周炎モデルの作成など今後さらなる検証が求められる.

2. 本研究の成果が歯周疾患の診断・治療に果たす役割について

本研究では、LPS 投与によって CD11b+細胞に破骨細胞分化能が骨髄と脾臓で認められた.さらに本論文では,示していないが TLR4 遺伝子が点変異した C3H/HeJ マウスを用いたとき骨髄と脾臓の CD11b+細胞集団は破骨細胞分化が抑制されたことを確認している.これらの結果より,TLR4 を阻害することによって破骨前駆細胞を抑制できる可能性が示唆される.他の報告では,破骨前駆細胞の TLR4/MyD88/NF- κ B のシグナルを減少させると骨粗鬆症モデルラットの骨吸収を抑制したとの報告もある(Vijayan et al, 2014).本研究を臨床に役立てるために,我々は CD11b-TLR4-CD14 の機能や働きをさらに解明し,新たな治療標的をしていく必要があると考えている.

これらの試問に対する回答は,適切かつ明解であった.また,桑田啓貴委員は主査の立場から,両副査の質問に対する回答の妥当性を確認した.

以上の審査結果から,本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した.